

CCD-986sk 세포 내 참깨 에탄올 추출물의 항주름 활성 연구

주 다 혜·유 단 희·이 진 영[†]

호서대학교 한방화장품과학과

(2016년 10월 13일 접수, 2016년 12월 5일 수정, 2016년 12월 16일 채택)

A Study on the Anti-wrinkle Activities of *Sesamum indicum* L. Ethanol Extracts on CCD-986sk

Da-Hye Joo, Dan-Hee Yoo, and Jin-Young Lee[†]

Department of Herbal Cosmetic Science, Hoseo University, 20 Hoseo-ro, Baebang-eup, Asan,
Chungcheongnam-do 31499, Korea

(Received October 13, 2016; Revised December 5, 2016; Accepted December 16, 2016)

요약: 본 연구에서는 참깨 추출물의 주름개선 화장품 원료로의 가능성을 확인하기 위하여, 참깨의 70% 에탄올 추출물을 제조하여, 엘라스타제 저해능, 콜라게나제 저해능, matrixmetalloproteinases (MMPs)의 단백질, mRNA 발현 저해 효능을 측정하였다. Elastase와 collagenase 저해활성은 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 각각 37.8%와 45%의 효소 활성을 억제해 나타내었다. 섬유아세포에서 참깨 에탄올 추출물의 세포 생존율을 확인한 결과 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 96%의 생존율을 보였다. 참깨 에탄올 추출물을 처리한 섬유아세포에서 matrix metalloproteinase-1 (MMP-1), matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), matrix metalloproteinase-3 (MMP-3)의 단백질 발현 및 mRNA 발현 억제 효과를 확인한 결과 단백질 발현은 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 63%, 43%, 49%의 저해율을 나타내었고, mRNA 발현 억제는 최고농도인 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 각각 82%, 79%, 82%의 저해율을 나타내었다. 이러한 결과로 보아 참깨 70% 에탄올 추출물이 주름개선용 기능성 화장품 소재로서의 응용이 가능할 것으로 판단되었다.

Abstract: In order to investigate the possibility of *Sesamum indicum* L. (*S. indicum*) extract as an active ingredient for wrinkle-care cosmetics, we prepared 70% ethanolic extract of *S. indicum* and measured its elastase inhibitory activity and collagenase inhibitory activity. We also evaluated the effect of *S. indicum* extract on protein and mRNA expression of MMPs in fibroblast cell (CCD-986sk). For anti-wrinkle effects, elastase inhibition activities and collagenase inhibition activities were 37.8% and 45% at a dose of 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of *S. indicum* 70% ethanol extract. For a cell viability test, measured on fibroblast cell by ethanol extract of *S. indicum*, results showed 96% with cell viability at 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentration. According to the results of western blot of ethanol extract from *S. indicum* the expression of the matrix metalloproteinase-1 (MMP-1), matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) protein was decreased by 63%, 43%, 49% at 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentration. Reverse transcription-polymerase chain reaction (PCR) of ethanol extract from *S. indicum* showed that the expression of MMP-1, MMP-2, MMP-3 mRNA was decreased by 82%, 79%, 82% at 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentration. The findings suggest that 70% ethanol extract from *S. indicum* has potential as a cosmeceutical ingredient with anti-wrinkle effects.

Keywords: *Sesamum indicum* L., anti-wrinkle, MMP-1, MMP-2, MMP-3

[†] 주 저자 (e-mail: jylee@hoseo.edu)
call: 041)540-9552

1. 서 론

현대 사회는 생활 패턴의 변화와 산업구조 발달, 고령화 인구 증가 및 소비자들의 의식수준이 높아지고 있으며, 점차 효능 및 효과에 대한 관심이 높아지고 있다. 그 가운데 “아름답게 나이를 먹는 것”을 실현시키기 위한 화장품 소재 개발이 요구되고 있다[1]. 피부 노화는 태양광선에 비노출 부위에서 나타나는 연대학적 노화(chronologic ageing)와 태양광선의 노출부에서 일어나는 광인성 노화(actinic ageing)로 구분된다. 미세한 주름과, 진피의 위축, 피하지방층의 감소 등은 연대학적 노화에서 관찰되며, 피부에 자외선이 노출되면 피부 구성성분인 collagen과 elastin이 변성되고, 거칠고 깊은 주름과 비정상적인 탄력섬유증 물질이 축적되어 피부가 두터워지고 느슨해지는 것은 광노화 과정에서 생성된다[2-4]. 생체 내 활성산소의 생성으로 인해 지질(과산화작용) 및 matrix metalloprotease (MMPs) 유전자와 collagen 분해 혹은 합성촉진의 연쇄적인 활성화를 유도함으로써 피부의 collagen을 구조적인 파괴 유발 및 피부탄력을 감소시키며, 피부주름 형성을 이끌게 된다[5,6]. MMPs는 구조와 기능적 특성에 따라 collagenase, gelatinase, stromelysin, matrilysin, membrane-type MMP (MT-MMP) 등으로 나누어진다[7]. MMP-1은 collagenase 1으로 알려져 있으며, type I 과 III collagen을 기질로 하며, stromelysin 1라고도 불리는 MMP-3은 기저막의 type IV collagen을 분해하며 zymogen인 pro MMP-1을 활성화시킨다[8]. Gelatinase인 MMP-2는 MMP-1에 의해 분해된 콜라겐 조각들을 더 잘게 분해해 피부 노화에 주요한 역할을 한다. MMPs 활성화에 의한 콜라겐 분해 현상은 자외선 조사에 따라 증가되는 전사인자 AP-1의 발현을 통한다[9,10]. 따라서 피부의 세포증식과 피부를 구성하는 기질물질을 증가시킴으로써 피부를 두껍게 할 수 있는 물질이나 피부를 구성하는 기질 물질인 collagen을 분해하는 MMPs의 생합성을 억제함으로써 피부의 주름, 탄력 상실 등의 증상을 완화시키는 것으로 연구되어져 왔다[11].

본 연구 소재인 참깨(*S. indicum*)는 참깨과(*Pedaliaceae*)에 속하는 1년생 초본식물로서 참깨과는 16속 60종으로 분류되며 *Sesamum*속은 37종이 있으며 주요재배종은 *S. indicum*이다[12]. 참깨는 단백질을 구성하는 아미노산에

는 함황아미노산(methionine 등)이 많이 함유되어 있으며, 무기질에서 특히 칼슘과 철이 다른 식품보다 많다. 쌀과 대두 등을 비교했을 때 칼슘, 인, 아연, 철, 비타민 B1, B2 및 니아신 등(비타민 A와 C는 함유하지 않음)이 풍부하게 함유되어 있다[13]. 참깨는 아시아에서 재배되는 아주 중요한 유지 종자 곡물로 인도가 세계생산량의 약 27%를 차지하고 있다. 참기름의 강력한 산화에 대한 안정성은 sesamol 때문이고 이는 자연오일에서 매우 소량만 존재한다[14]. 열대성 작물이었던 참깨가 한국과 같은 불량한 환경 조건에서 재배되면서, 유지 작물로서의 기본적인 기름 수율과 지방산 조성면에서나, 대표적인 항산화물질인 리그난 성분을 더 많이 함유하고 있는 것으로 다른 연구 보고에서 나타나고 있다[15,16]. 참깨 오일의 피부적용이 피부에 미치는 영향[17]과, 참깨 원산지에 따른 리그난 함량 변이[18], 참깨 종자의 항산화 활성차이[19] 등의 연구가 진행되어 왔지만, 참깨 에탄올 추출물을 이용한 항주름 효과의 검증은 미비한 상황이다. 이에 본 연구는, 참깨 에탄올 추출물을 이용하여 elastase, collagenase 저해활성과 피부 섬유아세포인 CCD-986sk를 이용하여 MMP-1, MMP-2, MMP-3의 단백질 발현 및 mRNA 발현억제 효과를 확인하여 주름 개선에 도움이 되는 기능성 화장품 소재로서의 가능성을 살펴보고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시료 추출

건조된 참깨를 파쇄 후 참깨 중량의 10배의 70% ethanol을 가하여 3 h 진탕 혼합하였다. 이후 상등액과 침전물을 분리하여 동일한 방법으로 3회 반복 추출하였다. 분리한 상등액은 여과지(Whatman No.2)를 이용하여 여과한 후 Eyela evaporator로 감압 농축하여 용매를 제거한 후 동결 건조하여 -20°C 에 보관하면서 시료로서 사용하였다.

2.2. 기기 및 시약

주름억제 효과 측정에 사용된 시약인 4-phenylazobenzoyloxycarbonyl-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg, porcine pancreas elastase, N-succinyl-L-ala-ala-p-nitroanilide, collagenase 등은 Sigma (USA)서 구입하였다. 세포 배양에 사용한 Isocove's modified Dulbecco's medium

(IMDM), fetal bovine serum (FBS), phosphate buffered saline (PBS), penicillin/streptomycin, trypsin은 Sigma (USA), Thermo Scientific Hyclone (USA) 및 Gibco (USA)에서 구입하여 사용하였다. 세포 독성 측정에 사용된 hemocytometer (Marienfeld, Germany), 3-[4,5-dimethylthiazol]-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT)는 Sigma (USA)에서 구입하였으며, dimethyl sulfoxide (DMSO)는 BioShop (Canada)에서 구입하여 사용하였다. Western blot의 1차 항체인 MMP-1, MMP-2, MMP-3, β -actin의 primary antibody와 goat anti-mouse 등의 secondary antibody는 Santa Crus (USA)에서 구입하였다. RT-PCR에 이용한 GoScript™ reverse transcription system은 Promega (USA)에서 구입하여 사용하였다. Davinch-Chemi™ imager CAS-400SM system (Davinch-K, Korea), UV transilluminator (BioTop, Switzerland), Mini-Protean® tetra cell, Mini Trans-Blot® cell (Bio-Rad, USA)을 사용하였다.

2.3. 세포 배양

본 실험에 이용한 CCD-986sk는 ATCC (American Type Culture Collection, USA)에서 분양받았으며, 배양은 10% FBS와 1% penicillin/streptomycin (100 U/mL)을 첨가한 IMDM 배지를 사용하였으며, 37 °C, 5% CO₂ incubator에 배양하였다.

2.4. Elastase 저해활성 측정

Elastase 저해활성 측정은 Cannell 등의 방법[20]에 따라 측정하였다. 기질로서 N-succinyl-(L-Ala)₃-p-nitroanilide (Sigma, USA)를 사용하여 37 °C에서 30 min간 기질로부터 생성되는 p-nitroanilide의 생성량을 445 nm에서 측정하였다. 즉, 각 시험용액을 일정 농도가 되도록 조제하여 40 μ L씩 96-well plate에 취하고, 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.6)에 녹인 2.5 U/mL porcine pancreas elastase (Sigma, USA)용액 40 μ L를 가한 후 기질로 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.6)에 녹인 N-succinyl-(L-Ala)₃-p-nitroanilide (0.5 mg/mL)을 80 μ L 첨가하여 30 min간 반응시켜 기질로부터 생성되는 p-nitroanilide의 생성량을 445 nm에서 측정하였다. Elastase 저해활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{효소활성 저해(\%)} =$$

$$(1 - \text{시료첨가군 흡광도} / \text{무첨가군 흡광도}) \times 100$$

2.5. Collagenase 저해활성 측정

Collagenase 저해활성 측정은 Wunsch E와 Heindrich HG의 방법[21]에 따라 측정하였다. 즉 반응구는 0.1 M Tris-HCl buffer (pH7.5)에 4 mM CaCl₂를 첨가하여, 0.3 mg/mL의 4-phenyl azobenzoyloxycarbonyl-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg를 녹인 기질액 125 μ L 및 시료용액 50 μ L의 혼합액에 0.2 mg/mL의 collagenase 75 μ L를 첨가하여 실온에서 20 min간 방치한 후 6% citric acid 250 μ L를 넣어 반응을 정지 시킨 후, ethyl acetate 1.5 mL를 첨가하여 320 nm에서 흡광도를 측정하였다. Collagenase 저해활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{효소활성 저해(\%)} =$$

$$(1 - \text{시료첨가군 흡광도} / \text{무첨가군 흡광도}) \times 100$$

2.6. MTT Assay에 의한 세포 생존율 측정

세포 생존율 측정은 Carmichael의 방법[22]에 따라 측정하였다. 섬유아세포(CCD-986sk)를 96-well plate에 5 \times 10⁴ cells/well이 되게 0.18 mL 분주하고, 시료를 농도별로 조제하여 0.02 mL 첨가한 후 37 °C, 5% CO₂ incubator에서 24 h 배양하였다. 대조군은 시료와 동량의 증류수를 첨가하여 동일한 조건으로 배양하였다. 여기에 2.5 mg/mL 농도로 제조한 MTT 용액 0.04 mL를 첨가하여 3 h 배양한 후 배양액을 제거하고 각 well 당 DMSO 0.1 mL를 가하여 실온에서 30 min간 반응시킨 뒤 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 독성 측정은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

2.7. Western Blot을 통한 단백질 발현 측정

주름개선인자인 MMP-1, MMP-2, MMP-3의 활성을 보기 위하여 세포주 CCD-986sk를 100 mm tissue culture dish에 분주한 후 24 h 동안 배양하여 세포를 안정화 시켰다. 배지를 제거한 후 추출물을 농도별로 처리한 배지로 24 ~48 h 배양한 후 다시 배지를 제거하고 PBS로 2번 세척해주었다. Radio-immunoprecipitation assay (RIPA) buffer 10 mL에 complete mini 1 tab를 가

Table 1. Sequence of the Primers Used for RT-PCR

Gene	Primer	Sequence (5' → 3')
GAPDH	Sense	TGA AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG GC
	Anti-sense	CAT GTA GGC CAT GAG GTC CAC CAC
MMP-1	Forward	AGC GTG TGA CAG TAA GCT AA
	Reverse	TTG CCA TCC TTC TCA AAG TTG TAG G
MMP-2	Forward	TTG CCA TCC TTC TCA AAG TTG TAG G
	Reverse	CAC TGT CCA CCC CTC AGA GC
MMP-3	Forward	TTG TTC TTT GAT GCA GTC AGC
	Reverse	GAT TTG CGC CAA AAG TGC

한 100 μ L로 용해해서 4 $^{\circ}$ C 13,200 rpm에서 20 min간 원심 분리하였다. 원심 분리하여 얻은 상층액은 BCA protein assay kit를 사용하여 정량하여 20 μ L의 단백질을 10% SDS-PAGE상에서 전기영동하여 분리하였다. 분리된 단백질을 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane에 옮긴 다음 실온에서 1 h blocking buffer (5% skim milk in TBST)에서 배양시켰다. 1차 항체를 희석하여 4 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 반응시킨 뒤, 다시 10 min 간격으로 tris-buffered saline and tween 20 (TBST)로 3회 세척하고 2차 항체를 실온에서 2 h 배양하였다. 3회 세척한 후 Davinch-ChemiTM imager CAS-400SM system를 이용하여 밴드 확인 및 정량하였다.

2.8. Reverse Transcription PCR을 통한 mRNA 발현 측정

2.8.1. Total RNA 분리 및 cDNA 합성

세포를 100 mm culture dish에 cell seeding한 뒤 24 h 동안 배양한 후 추출물을 농도별로 처리하여 24 h 동안 배양하였다. 배지 상층액을 제거한 후 trizol lysis buffer를 각 well에 1 mL씩 분주하여 세포를 lysis 한 후 chloroform 200 μ L를 분주하여 20 s간 위아래로 흔들어 주었다. 그 후 13,200 rpm에서 20 min간 원심 분리하여 상층액을 isopropanol 0.5 mL이 들어있는 튜브에 옮겨 섞었다. 다시 13,200 rpm에서 20 min간 원심분리 하였고, 그 상층액을 제거한 후 75% EtOH-DEPC water를 각 튜브에 1 mL씩 분주하여 13,200 rpm에서 5 min간 원심 분리한 뒤 상층액을 제거한 뒤 실온에서 건조시켰다. DEPC를 50 μ L씩 분주하여 녹인 후 96-well plate에 RNA 5 μ L와 멸균수 195 μ L를 첨가하여 260 nm, 280 nm에서 각각 흡광도를 측정하여 total RNA양을 측

정하였다. Oligo (dT) 15 primer (500 μ g/mL) 1 μ L, 추출한 RNA (2 μ g)와 nuclease free water로 10 μ L를 맞추고 75 $^{\circ}$ C에서 5 min간 반응시킨 후 5X reaction buffer, MgCl₂, PCR nucleotide mix, RNasin[®] inhibitor, reverse transcriptase, nuclease-free water를 첨가하여 25 $^{\circ}$ C에서 5 min, 42 $^{\circ}$ C에서 60 min, 70 $^{\circ}$ C에서 15 min간 반응시켜 cDNA를 합성시켰다.

2.8.2. Reverse Transcription PCR

MMP-1, MMP-2, MMP-3인자들에 대한 mRNA 발현을 알아보기 위하여 PCR을 실시하였다. 실험에 사용한 primer sequences는 Table 1과 같다. PCR tube에 5X green GoTaq Flexi buffer, MgCl₂, PCR nucleotide mix (10 mM), primer, GoTaq DNA polymerase, nuclease free water, 합성한 cDNA를 첨가하여 잘 섞은 후 PCR을 실행하였다. MMP-1, MMP-2, MMP-3는 각각 94 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 60 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min (35 cycles)를 하였다. PCR로 합성시킨 후 0.002% ethidium bromide가 첨가한 1.5% agarose gel에 100 V에서 40 min간 전기영동 후 UV transilluminator을 이용하여 밴드를 확인하여 분석 정량하였다.

2.9. 통계처리

모든 실험은 3회 반복으로 행하여 평균치와 표준편차로 나타내었고, 결과 통계처리는 SPSS10.0 (USA) software를 사용하였으며, 유의차 검증은 분산분석 (analysis of variance ANOVA)을 한 후 $\alpha = 0.05$ 수준에서 Turkey's HSD test에 의해 유의성을 분석하였다.

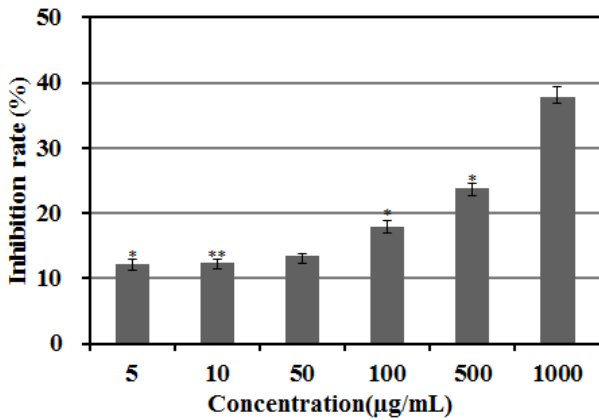


Figure 1. Effect of *S. indicum* on inhibition of elastase. Each values represents mean \pm S.D. of three individual experiments. Significant as compared to control (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

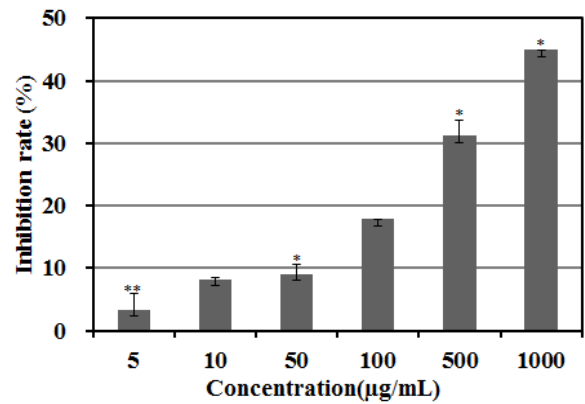


Figure 2. Effect of *S. indicum* on inhibition of collagenase. Each values represents mean \pm S.D. of three individual experiments. Significant as compared to control (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

3. 결과 및 고찰

3.1. Elastase 활성 억제

내인성 피부노화는 피부의 진피 조직 속에 구성되어 있는 collagen과 피부의 탄력성에 관련된 elastin이 그물망 구조를 형성하고 있는데, 이러한 그물망 구조가 깨어지면서 즉, elastin이 elastase에 의해 분해되어 피부가 처지고 주름이 생긴다[23]. 피부 주름의 형성과 밀접하게 연관되어 있는 elastin 분해 효소인 elastase의 활성을 저하시킴으로 인해 피부노화를 억제할 수 있다. 그러므로 참깨 에탄올 추출물이 elastase 활성에 미치는 영향을 실험한 결과 참깨 에탄올 추출물에서 농도가 증가함에 따라 효소활성을 억제하는 것을 확인할 수 있었으며, 최고농도 1000 µg/mL에서 37.8%로 효소 활성 억제를 나타내었다(Figure 1).

3.2. Collagenase 활성 억제

표피, 진피, 피하조직으로 구성되어 있는 피부는 collagen은 진피층의 80 ~ 90%를 차지하고 있는 주요 구조 단백질로 type- I collagen이 대부분을 차지하며 type-II collagen, fibronectin 등으로 구성되어 있다. 나이가 증가함에 따라 섬유아세포의 작용과 세포수가 감소하여 collagenase의 작용이 증가하여 콜라겐의 가교된 형태가 증가함으로써 매끄러움, 수분, 탄력이 감소된다. collagen의 감소는 피부노화 및 주름생성과 매우 밀접한 관계를 가지고 있다[24-26]. 본 실험에서는 세

포외기질 단백질을 분해하는 효소로 피부의 주름생성을 촉진시키는 collagenase 활성에 미치는 영향을 측정 한 결과 500 µg/mL 농도에서 31%, 최고농도 1000 µg/mL에서는 45%로 활성을 억제하였으며, 억제 효과는 농도가 증가함에 따라 유의하게 증가하였다(Figure 2). 이와 같은 결과로 보아 참깨 추출물은 피부탄력 저하 활성 효능을 지니기에 기능성 소재로서의 가능성을 보여주었다.

3.3. MTT 분석법을 이용한 세포 생존율

MTT 분석법은 미토콘드리아의 호흡연쇄에 의해 환원시키는 효소능력을 이용한 방법으로 탈수소 효소작용에 의해 담황색 기질인 MTT tetrazolium을 자주색을 띄는 비수용성의 MTT formazan을 생성시키며, 그 생성량을 측정하는 검사법으로 흡광도는 550 nm 근처 파장에서 최대가 된다[27]. 섬유아세포에서 참깨 에탄올 추출물 처리가 세포증식에 미치는 영향을 확인하기 위해서 MTT assay를 이용하여 세포 생존율을 측정하였다(Figure 3). 참깨 에탄올 추출물을 농도별(5, 10, 50, 100, 500, 1000 µg/mL)로 처리하였고, 그 결과 100, 500, 1000 µg/mL에서 96%, 64%, 51%로 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 본 연구에서 CCD-986sk 세포 내의 단백질발현 및 mRNA 발현 측정을 확인하기 위해서 세포 생존율이 100% 가까운 농도인 25, 50, 100 µg/mL을 사용하였다.

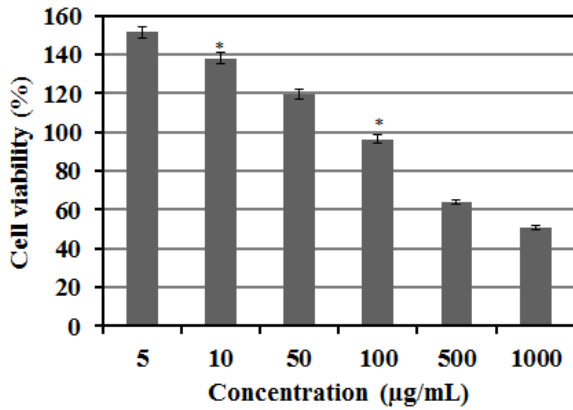


Figure 3. Effect of *S. indicum* on proliferation of CCD-986sk. CCD-986sk cells were incubated for 24 h in IMEM medium containing 10% FBS, were treated with various concentrations of *S. indicum* for 24 h and cell viability was measured by MTT reagent. Each values represents mean ± S.D. of three individual experiments. Significant as compared to control (**p* < 0.05, ***p* < 0.01).

3.4. MMP-1, MMP-2, MMP-3의 단백질 발현의 억제효과 확인

MMPs는 현재까지 약 20여 종 이상의 종류가 있는 것으로 알려져 있으며, 활성 중심부에 아연을 갖는 금속 단백질 분해 효소로서 구조와 기능에 따라 collagenase, stromelysin, interstitial, gelatinase, membrane type MMP 등으로 구분하기도 한다[28]. MMP-1, MMP-2, MMP-3 활성의 억제는 collagen 분해를 감소시킬 수 있고 이는 피부의 주름 형성을 억제 시킬 수 있을 것이라고 판단하였고, MMP-1, MMP-2 및 MMP-3 유전자의 단백질 발현변화를 측정하였다(Figure 4). UVA를 처리한 구간과 처리하지 않은 구간을 비교하여 Con과 Nor로 표시하였고, UVA를 처리함으로써 MMPs가 활성화된 것을 확인할 수 있었다. 그 결과 MMP-1은 농도가 증가함에 따라 단백질 발현이 억제되는 것을 확인할 수 있었고, MMP-2의 단백질 발현 결과 참깨 에탄올 추출물을 처리하지 않는 control군과 비교했을 때 100 µg/mL에서 43%의 발현 억제를 보였다. MMP-3는 농도가 증가함에 따라서 단백질 발현이 억제되었고, 100 µg/mL에서 49% 단백질 발현 억제율을 확인할 수 있었다.

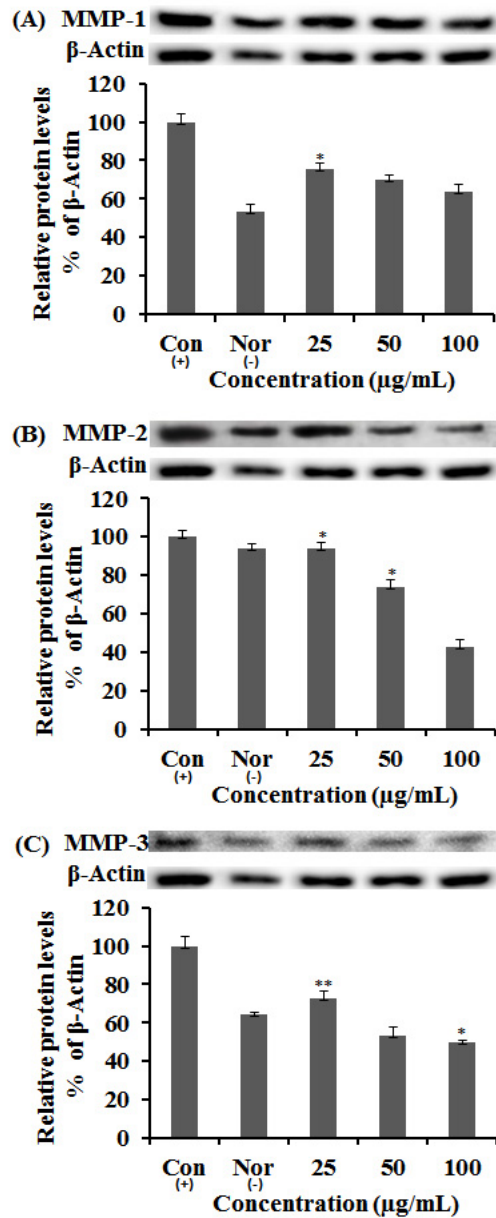


Figure 4. Effect of *S. indicum* on MMP-1 (A), MMP-2 (B), MMP-3 (C) protein expression. CCD-986sk cells were incubated for 24 h in IMEM medium containing 10% FBS were treated with various concentrations of *S. indicum* for 24 h and then total protein was isolated. MMP-1, MMP-2, MMP-3 protein level was determined by western blot. Each values represents mean ± S.D. of three individual experiments. Significant as compared to control (**p* < 0.05, ***p* < 0.01).

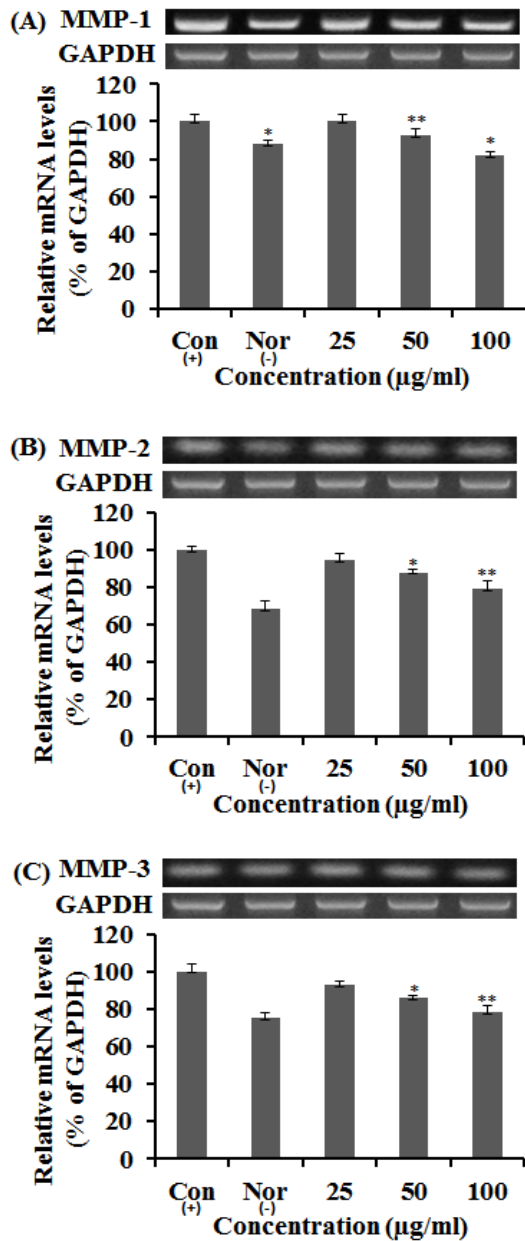


Figure 5. MMP-1 (A), MMP-2 (B), MMP-3 (C) mRNA expression rate of extract from *S. indicum* on fibroblast cell (CCD-986sk). After CCD-986sk cells were started in serum free medium free medium for 1 h the cells were treated with 25, 50 and 100 µg/mL of ethanol extracted of *S. indicum* for 24 h. Each values represents mean ± S.D. of three individual experiments. Significant as compared to control (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

3.5. MMP-1, MMP-2, MMP-3의 mRNA 발현의 억제효과 확인

MMP는 UV조사에도 피부 내의 활성이 증가되며, 증가된 MMP들에 의해 진피층의 collagen을 붕괴시킴으로써, 피부 광노화에 매우 큰 역할을 하고 있다. 활성화된 MMP는 tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMP)이나 2α-macroglobulin와 같은 저해제에 의해 활성이 조절되고 있으며, 피부의 keratinocyte, fibroblast를 포함한 대다수의 많은 세포들이 MMP를 분비한다 [29,30]. UVA에 의해 발현이 증가되는 MMPs에 참깨 에탄올 추출물이 미치는 영향을 알아보고자 섬유아세포에 UVA를 조사하였다. 본 연구에서는 MMP-1 및 MMP-2, MMP-3 각각의 mRNA 발현을 확인하기 위하여 참깨 에탄올 추출물을 처리한 결과 control군과 비교했을 때 MMP-1는 농도가 증가함에 따라서 유의하게 억제되었으며, Sim[31]의 설련의 mRNA 발현 저해효과를 비교했을 때 MMP-1의 발현이 유의한 것을 확인할 수 있었다. MMP-2의 mRNA 발현 결과 농도가 증가함에 따라서 발현이 억제되는 것을 확인할 수 있었다. MMP-3의 mRNA 발현 결과 참깨 에탄올 추출물을 처리한 구간에서 처리하지 않는 control 부분과 비교시 mRNA를 억제하는 것을 확인할 수 있었다(Figure 5).

4. 결 론

참깨 에탄올 추출물을 이용하여 elastase, collagenase 저해활성 실험과 CCD-986sk 섬유아세포에서의 MMP-1, MMP-2, MMP-3의 단백질 발현 및 mRNA 발현억제 효과를 확인하였고 그 결과 elastase 저해활성은 농도가 증가함에 따라 효소활성을 억제하는 것을 확인하였고, 최고농도 1000 µg/mL에서 37.8%로 효소 활성을 억제를 나타내었다. Collagenase 저해활성은 500 µg/mL 농도에서 31%, 최고농도 1000 µg/mL에서는 45%로 활성을 억제하였으며, 억제 효과는 농도가 증가함에 따라 유의하게 증가하였다. 세포 생존율을 MTT 분석법을 통해 확인한 결과 농도 구간이 100 µg/mL일 때 96%의 생존율을 보였으며, 따라서 관련 실험을 세포 생존율이 100%에 가까운 25, 50, 100 µg/mL에서 진행하였다. MMP-1 및 MMP-2, MMP-3 단백질 발현을 측정된 결과 참깨 에탄올 추출물을 처리하지 않은 구간인 control군과 비교했을 때 MMP-1는 100 µg/mL 농도에서

63%를 나타내었고, 농도가 증가함에 따라 유의하게 감소한 것을 확인할 수 있었다. MMP-2는 농도가 증가하면서 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도구간에서 43%의 단백질 발현이 억제되는 것을 확인할 수 있었다. MMP-3는 함께 에탄올 추출물 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 49%로 단백질 발현을 억제하였고, 농도가 증가함에 따라 발현을 억제하는 것을 확인할 수 있었다. MMP-1, MMP-2 및 MMP-3 mRNA 발현 저해활성을 측정한 결과 MMP-1은 함께 에탄올 추출물을 처리하지 않은 구간인 control부분과 비교했을 때 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 mRNA를 82%로 감소하였고, MMP-2는 함께 에탄올 추출물을 농도별로 처리한 구간에서 농도가 증가함에 따라 유의하게 감소하는 것을 확인할 수 있었다. MMP-3는 농도가 증가함에 따라서 mRNA 발현이 감소하였으며, 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 82%의 mRNA 발현이 억제된 것을 확인하였다. 따라서 함께 에탄올 추출물이 피부 주름의 형성을 억제하는 것으로 확인할 수 있었으며, 추후 성분적인 특징에 대한 연구가 추가적으로 진행된다면, 이를 이용한 화장품 기능성 천연소재로 응용이 가능할 것으로 판단된다.

Acknowledgement

“이 논문은 2015년도 호서대학교의 재원으로 학술연구비 지원을 받아 수행된 연구임”(2015-0100).

Reference

1. H. S. Lee and S. H. Kim, Safety evaluation of black garlic extract for development of cosmeceutical ingredients-skin irritation and sensitization studies, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **39**(8), 1213 (2010).
2. M. Takahashi, Image analysis of skin surface contour, *Acta Derm. Venereol. Suppl. (Stockh)*, **185**, 9 (1994).
3. J. Uitto, M. J. Fazio, and D. R. Olsen, Molecular mechanisms of cutaneous aging. Age-associated connective tissue alterations in the dermis, *J. Am. Acad. Dermatol.*, **21**(3), 614 (1989).
4. I. M. Braverman and E. Fonferko, Studies in cutaneous aging, *Soc. Invest. Dermatol.*, **78**(5), 444 (1982).
5. H. J. Park, S. M. Ock, H. J. Kim, H. J. Park, Y. B. Lee, J. M. Choi, C. S. Cho, J. Y. Lee, B. K. Cho, and D. H. Cho, Vitamin C attenuates ERK signaling to inhibit the regulation of collagen production by LL-37 in human dermal fibroblasts, *Exp. Dermatol.*, **19**(8), 258 (2010).
6. P. T. Pugliese, The skin, free radicals, and oxidative stress, *Dermatol. Nurs.*, **7**(6), 361 (1995).
7. G. L. Fisher, H. S. Talwar, J. Lin, P. Lin, F. McPhillips, Z. Wang, X. Li, Y. Wan, S. Kang, and J. J. Voorhees, Retinoic acid inhibits induction of c-Jun protein by ultraviolet radiation that occurs subsequent to activation of mitogen-activated protein kinase pathways in human skin *in vivo*, *J. Clin. Invest.*, **101**(6), 1432 (1998).
8. G. J. Fisher, S. C. Datta, H. S. Talwar, Z. Q. Wang, J. Varani, S. Kang, and J. J. Voorhees, Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism, *Nature*, **379**, 35 (1996).
9. H. J. Moon, S. R. Lee, S. N. Shim, S. H. Jeong, V. A. Stonik, V. A. Rasskazov, T. Zvyagintseva, and Y. H. Lee, Fucoidan inhibits UVB-induced MMP-1 expression in human skin fibroblasts, *Biol. Pharm. Bull.*, **31**(2), 284 (2008).
10. L. Rittie and G. J. Fisher, UV-light-induced signal cascades and skin aging, *Ageing Res. Rev.*, **1**(4), 705 (2002).
11. S. G. Park, S. N. Kim, J. C. Lee, H. S. Kim, Y. J. Kim, B. G. Lee, and I. S. Jang, Anti-aging effect on skin with Jaeum-Dan (JED), *Kor. J. Herbology.*, **19**(1), 67 (2004).
12. E. A. Weiss, Oilseed crops, Longman, London, **31**, (1983).
13. S. J. Park and M. H. Kang, Functional properties of sesame seed, *Food Ind. Nutr.*, **9**(2), 31 (2004).
14. P. Dhar, K. Chattopadhyay, D. Bhattacharyya, and S. Ghosh, Antioxidative effect of sesame lignans in diabetes mellitus blood : an *in vitro* study. *J. Oleo. Sci.*, **54**(1), 39 (2005).
15. M. J. Lee and K. H. kim, The comparison in the physicochemical properties of sesame seeds by producing areas, *J. Korean Sou. Appl. Biol. Chem.*,

- 48(2), 128 (2005).
16. S. N. Ryu and E. J. Lee, Recent studies of physicochemical properties in sesame oil, *Korea J. Intl. Agri.*, **13**(3), 207 (2001).
 17. Y. A. Song and H. S. Ahn, Influence in application of sesame seed oil to the skin on a change in the aging and dry skin condition, *The Korea Society for Aesthetics and Cosmetology*, **9**(4), 103 (2011).
 18. S. N. Ryu, E. J. Lee, H. S. Yoon, and S. S. Kang, Chemical structure and physiological activity of lignan component in sesame, *Korea J. Crop Sci.*, **48**, 65 (2003).
 19. Y. H. Kim, Differences of antioxidant contents and antioxidative activity of sesame seeds by producing areas, *Kor. J. Hort. Sci. Technol.*, **44**(6), 846 (2003).
 20. R. J. Cannell, S. J. Kellam, A. M. Owsianka, and J. M. Walker, Results of a large scale screen of microalgae for the production of protease inhibitors, *Planta Med.*, **54**(1), 10 (1988).
 21. E. Wuensch and H. G. Heidrich, On the quantitative determination of collagenase, *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.*, **333**, 149 (1963).
 22. J. Carmichael, W. G. DeGraff, A. F. Gazdar, J. D. Minna, and J. B. Mitchell, Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of radiosensitivity, *Cancer Res.*, **47**(4), 943 (1987).
 23. S. Y. Lee, J. H. An, H. Chun, and H. Y. Cho, Isolation and characterization of MMP-1 inhibitor peptide from *Crataegus pinnatifida* bunge in fibroblast cellline HS68 cells, *J. Appl. Biol. Chem.*, **46**(1), 60 (2003).
 24. Y. Matsumura and H. N. Ananthaswamy, Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **195**(3), 298 (2004).
 25. N. M. Kim, B. S. Koo, S. G. Lee, E. I. Hwang, S. H. So, and J. H. Do, Effect of Korean red ginseng on collagen biosynthesis and MMP-I activity in human dermal fibroblast, *J. Ginseng Res.*, **31**(2), 86 (2007).
 26. B. Yang, C. Ji, J. Kang, W. Chen, Z. Bi, and Y. Wan, Trans-Zeatin inhibits UVB-induced matrix metalloproteinase-1 expression via MAP kinase signaling in human skin fibroblasts, *Int. J. Mol. Med.*, **23**(4), 555 (2009).
 27. H. Ukeda, S. Maeda, T. Ishii, and M. Sawamura, Spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on tetrazolium salt 3'-{1-[(phenylamino)carbonyl]-3, 4-tetrazolium}-bis (4-methoxy-6-nitro) benzenesulfonic acid hydrate reduction by xanthine-xanthine oxidase, *Anal. Biochem.*, **251**(2), 206 (1997).
 28. H. Nagase and J. F. Woessner, Matrix metalloproteinases, *J. Biol. Chem.*, **274**(31), 21491 (1999).
 29. G. J. Fisher, H. S. Talwar, J. Lin, P. Lin, F. McPhillips, Z. Wang, X. Li, Y. Wan, S. Kang, and J. J. Voorhees, Retinoic acid inhibits induction of c-Jun protein by ultraviolet radiation that occurs subsequent to activation of mitogen-activated protein kinase pathways in human skin *in vivo*, *J. Clin. Invest.*, **101**(6), 1432 (1998).
 30. G. S. Sim, J. H. Kim, D. H. Lee, S. M. Park, H. B. Pyo, Y. H. Zhang, and B. C. Lee, Effects of the *Spatholobi caulis* extract on antioxidation and inhibition of matrix metalloproteinase in human skin fibroblasts, *Korean Soc. Biotechnol. Bioeng. J.*, **20**(1), 40 (2005).
 31. G. S. Sim, J. H. Kim, Y. Na, D. H. Lee, B. C. Lee, Y. H. Zhang, and H. B. Pyo, Anti-oxidative and inhibitory effect of *Saussurea involucreta* on MMP-1 in UVA-irradiated human dermal fibroblast, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **31**(4), 329 (2005).